

Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3

I. — Détermination de l'activité spécifique de transestérification — comparaison entre interestérification et hydrolyse dans l'action des lipases

J. MUDERHWA, M. PINA et J. GRAILLE (1)

Résumé. — L'activité spécifique de transestérification de 3 lipases régiosélectives 1-3 issues de 3 microorganismes différents (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus* et *Mucor miehei*) mises en œuvre sous différentes formes [lipase en l'état, lipase fixée (célite) ou immobilisée (résine) et cellules dévitalisées] a été déterminée sur deux substrats, l'huile de coprah et le stéarate de méthyle, mis en réaction dans un rapport 20/1 molaire. La meilleure activité a été obtenue avec la lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur résine (lipozyme TM). Toutefois l'aptitude à la réaction d'interestérification montrée par les enzymes mises en œuvre sous forme de cellules pourrait s'avérer particulièrement intéressante d'un point de vue économique, d'autant que leur recyclage n'altère pratiquement pas leur efficacité. Un parallèle effectué entre activité lipolytique et activité d'interestérification montre que ces deux activités sont indépendantes l'une de l'autre.

INTRODUCTION

L'interestérification est une réaction dans laquelle, dans des conditions appropriées de température et de milieu, des esters réagissent en échangeant leurs chaînes acylées [1-4]. Appliquée aux corps gras, il en résulte une profonde modification de la répartition naturelle des chaînes grasses et par conséquent des propriétés physiques des corps gras. Cette réaction permet notamment d'obtenir, par une combinaison judicieuse, des produits ayant une composition en acides gras et des propriétés rhéologiques définies à l'avance. On distingue 3 grands types d'interestérification : chimique stochastique, chimique dirigée et enzymatique régiosélective 1-3.

L'interestérification chimique stochastique conduit à une distribution statistique des acides gras sur les 3 positions du glycérol [5-10]. C'est une réaction rapide, en général complète au bout de 30 min à 90 °C. La réaction doit être effectuée sur un substrat presque entièrement raffiné et en milieu anhydre faute de quoi le catalyseur, généralement le méthylate de sodium, serait inactivé.

L'interestérification dirigée [1, 11-12] consiste à faire la même réaction en milieu solvant et à des températures (0-30 °C) telles qu'une cristallisation partielle ou importante des triglycérides saturés se produise au cours de la réaction. Le produit cristallisé peut être extrait au fur et à mesure de sa formation ou rester dans le mélange et séparé ultérieurement.

L'interestérification enzymatique présente, du point de vue théorique, de nombreux avantages par rapport à l'interestérification chimique et qu'il convient de rappeler :

- les lipases opèrent en conditions douces de températures (35 à 60 °C) et de pression ; on devrait observer une économie d'énergie substantielle et un gain de qualité ;
- les réactions enzymatiques sont lentes, ce qui permet de contrôler la réaction sur le plan cinétique ; il est donc possible d'élaborer des gammes de produits aux caractéristiques distinctes ;
- la catalyse enzymatique est moins polluante ;
- enfin elle peut être spécifique, ce qui implique des applications biotechnologiques particulières.

L'interestérification enzymatique est aujourd'hui largement étudiée ; on compte quelques brevets [13-16] et un certain nombre de publications [17-28].

Le principe de base consiste à mettre en contact le mélange d'huiles à traiter avec une lipase non spécifique ou 1,3 spécifique en l'état ou fixée sur un support ; la réaction est effectuée à une température en général de 35 à 60 °C en fonction en principe de l'optimum de l'enzyme, soit en présence d'un solvant organique inerte [15, 18, 19, 21], soit en milieu fondu [14, 16, 26, 28] c'est-à-dire sans solvant (milieu auquel une faible quantité d'eau est ajoutée, en général de l'ordre de 0,2 à 1 % du poids des réactifs afin d'activer l'enzyme), soit en microémulsions inverses [25]. L'interestérification enzymatique catalysée par une lipase non spécifique conduit à une distribution statistique des acides gras sur les 3 positions du glycérol et elle est de ce fait comparable à l'interestérification chimique, mais elle conserve l'avantage d'être mieux contrôlée sur le plan cinétique.

L'interestérification régiosélective 1,3 (IR 1,3) biocatalysée par une lipase 1,3 spécifique n'affecte que les positions 1 et 3 des triglycérides et de ce fait limite la distribution au hasard seulement à ces 2 positions conduisant à un nombre de triglycérides plus restreint [27, 29]. En plus des avantages précités de l'interestérification enzymatique sur l'interestérification chimique, l'IR 1-3 présente les avantages technologiques suivants :

- la composition des acides gras en position 2 des triglycérides reste inchangée. Or cette position est particulièrement riche dans la plupart des huiles végétales en acides gras insaturés essentiels ; il est donc intéressant sur le plan nutritionnel de les conserver sur cette position car les 2 monoglycérides issues de la digestion pancréatique sont les transporteurs principaux des acides gras essentiels à travers la paroi intestinale [30, 31] ;
- la formation de triglycérides à haut point de fusion généralement observée dans les réactions d'interestérification chimique est évitée ou considérablement limitée ;
- l'interestérification classique exige de travailler sur des substrats partiellement raffinés et anhydres ; ceci n'est plus nécessaire dans le cas de l'IR 1,3 ;
- le fait de pouvoir travailler sur des substrats bruts ou succintement raffinés à une température relativement basse, permet de réaliser une économie d'énergie substantielle.

(1) Division Chimie des Corps Gras, IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

Cependant, malgré tous ces avantages, le prix des lipases ainsi que les moyens à mettre en œuvre pour interestérifier à grande échelle sont jugés coûteux par les industriels, ce qui fait que l'interestérification biocatalysée est probablement rarissime au stade pilote ou industriel.

L'approche de l'IR 1,3, pour d'une part ajuster l'insaturation des huiles végétales, notamment l'huile de palme ou sa fraction concrète et d'autre part obtenir des bases grasses convenables, nécessite en plus de la détermination de la répartition des acides gras des huiles utilisées, la détermination de l'activité d'interestérification permettant une comparaison significative et fiable de divers biocatalyseurs mis en œuvre sous différentes formes. Le premier volet de notre étude consistera en la mise au point d'un test de détermination de l'activité de transestérification (AST). Les résultats acquis liés aux paramètres tels que la constante de vitesse et le taux de conversion permettront de sélectionner des lipases dont l'activité est compatible avec les contraintes des réactions industrielles.

L'activité d'hydrolyse dans les conditions classiques sera comparée à l'activité d'interestérification. La relation entre les 2 activités, si elle existe, indiquera s'il est commode d'exprimer l'activité d'interestérification en terme d'unité hydrolytique.

Dans une 2^e partie, on étudiera l'influence de l'activité de l'eau sur le taux de conversion ; le seuil de démarrage de la réaction d'hydrolyse sera ainsi déterminé pour différents biocatalyseurs.

Enfin dans une 3^e partie, on vérifiera, si la spécificité 1-3 des lipases étudiées est conservée ou du moins suffisamment stable pour être compatible avec les durées des réactions industrielles. Pour cela il suffira de déterminer la composition des acides gras en position β ; si la régiosélectivité 1-3 est stable cette composition demeurera constante et égale à la composition initiale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériels biologiques.

Trois lipases issues de 3 micro-organismes différents (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus* et *Mucor miehei*) sont mises en œuvre sous différentes formes : en l'état, supportées (fixées sur la célite) ou immobilisées (résine) et sous forme de cellules dévitalisées en l'état ou incluses dans des billes d'alginate de calcium.

Candida deformans et *Mucor miehei* proviennent du Centraal Bureau voor Schimmelcultures Yeast Division, Delft (Pays-Bas). La lipase et les cellules de ces souches ont été produites et purifiées par Muderhwa *et al.* [33, 34], puis lyophilisées. La lipase de *Rhizopus arrhizus* est commerciale et nous a été fournie par la Société Gist-Brocades. Le mycélium dévitalisé provient de la société SANOFI. Deux préparations enzymatiques de *Mucor miehei* ont été fournies par la Société Novo Industri (Danemark) :

- 1) Le lipozyme : solution enzymatique diafiltrée puis lyophilisée ;
- 2) Le lipozyme T_M : où la lipase immobilisée est fortement liée à une résine macroporeuse échangeuse d'anions ;
 - Le stéarate de méthyle est préparé à partir d'acide stéarique à 99 % de pureté porté 1 h au reflux d'un mélange de méthanol/acide sulfurique 95/5 (V/V) ;
 - L'huile de coprah purifiée sur une colonne d'alumine selon la méthode IUPAC [35] provient de la Société NHRM (Marseille). Elle contient 48,0 % molaires d'acide laurique dont 32,8 % sont répartis sur les 2 positions externes.

Préparations des catalyseurs biologiques.

L'absorption des lipases sur la célite est effectuée selon la méthode de Fuji Oil [14] de telle sorte que 10 g de lipase soient adsorbés par 25 g de célite.

L'immobilisation par inclusion des cellules dans des billes d'alginate de calcium s'effectue selon une technique inspirée des travaux de Davis *et al.* [36], Spetalli *et al.* [37] et Kristan et Coughlan [38].

Techniques analytiques.

Les protéines des préparations enzymatiques sont dosées par la méthode de Lowry [39]. La teneur en eau des substrats et des biocatalyseurs ainsi que l'eau résiduelle des levures lyophilisées ont été déterminées par la méthode de Karl Fisher. Dans ce dernier cas, les protéines sont alors dosées selon la méthode de Stickland [40] mettant en œuvre la réaction au biuret.

La détermination de l'activité lipolytique (AL) des biocatalyseurs a été déterminée avec le milieu réactionnel de Menassa [41] sur une émulsion d'huile de colza dans le PVA (alcool polyvinylique) 5 % (P/V) à pH 7,0 (tampon tris maléate 2,5 mM) à 50 °C selon la technique de Muderhwa *et al.* [33].

La mesure de l'activité de l'eau (*a_w*) des substrats et des biocatalyseurs mis en œuvre a été mesurée à 25 °C par le thermoconstanter humidat — TH2 de Novosina (Suisse).

La répartition interne/externe des acides gras des triglycérides des huiles de coprah natives et transestérifiées est effectuée selon la méthode de Brockerhoff [42] adaptée par Muderhwa *et al.* [43] par dégradation ménagée non spécifique par le bromure d'éthylmagnésium 3M dans l'éther éthylique.

Les triglycérides des huiles de coprah natives et transestérifiées sont transformés directement en esters méthyliques par le méthylate de sodium et le méthanol chlorhydrique selon la norme AFNOR [44]. Les esters méthyliques sont analysés en CPG avec une colonne capillaire de silice fondue DB Wax 30 W (J et W. USA) selon les conditions décrites par Muderhwa *et al.* [43].

Réaction de transestérification.

Conditions opératoires.

La réaction s'effectue à 50 °C dans un erlenmeyer à double entrée sous agitation magnétique et sous pression réduite (25 mm Hg) avec les mélanges réactionnels suivants : soit 5 g d'huile de coprah purifiée et 2,2 g de stéarate de méthyle dans le cas des réactions équimoléculaires, soit 5 g d'huile de coprah purifiée et 0,11 g de stéarate de méthyle quand la réaction s'effectue dans un rapport molaire 20/1 ; la quantité de préparation enzymatique ajoutée varie selon l'expérience.

Après réaction, les esters méthyliques sont séparés des triglycérides par CCM préparative, puis analysés en CPG.

Calcul du taux de conversion (X).

L'acide laurique (C12 : 0) est l'acide gras traceur de la réaction. L'incorporation « x » en % molaire de C12 : 0 dans le stéarate de méthyle à l'instant « t » est étudiée dans les systèmes huile de coprah-stéarate de méthyle.

On peut déterminer la concentration « a » en % molaire de C12 : 0 incorporé dans le stéarate de méthyle à l'équilibre : sachant d'une part que le % molaire de C12 : 0 sur chaque position externe des triglycérides de l'huile de coprah utilisée est de 32,8 % et qu'il est nul dans le stéarate de

méthyle et d'autre part qu'une molécule de triglycérides est assimilée à 300 chaînes et celle de stéarate de méthyle est assimilée à 100 chaînes, on en déduit « a » :

$$\begin{aligned} & \text{— pour la réaction équimoléculaire,} \\ a &= \frac{(32,8 \times 2) + 0}{200 + 100} = 0,22 \text{ ou } 22 \% \text{ molaires ;} \\ & \text{— pour la réaction 20/1 molaire,} \\ a &= \frac{((32,8 \times 2) \times 20) + 0}{(200 \times 20) + 100} = 0,32 \text{ ou } 32 \% \text{ molaires.} \end{aligned}$$

Dans chacun des systèmes, « a » est la concentration en C12 : 0 dans la fraction « esters méthyliques » vers laquelle on tend à l'équilibre. On définit ainsi le **taux de conversion** $X = x/a$.

Si on considère la réaction comme étant de premier ordre, la vitesse de réaction dx/dt est proportionnelle à $(a - x)$; on en déduit $dx/dt = k(a - x)$, k étant la constante de vitesse. Il vient :

$$k = 1/t \ln a/a - x = 1/t \ln 1/1 - X, \text{ où } t \text{ est exprimé en min. La vitesse initiale est définie par}$$

$dx/dt = kx$ (x incorporé à l'équilibre) = ka . L'activité initiale en $\mu\text{moles de C12 : 0}$ incorporées dans le stéarate de méthyle par min et par gramme de biocatalyseur peut donc être représentée comme l'activité spécifique de transestérification (AST) avec

$$AST = a.M.k/W = \frac{a.M}{Wt} \ln \frac{a}{a-x}$$

où $M = \mu\text{moles de stéarate de méthyle mis en jeu}$ et $W = \text{quantité de biocatalyseur en g.}$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — Détermination de la constante de vitesse, de l'activité spécifique de transestérification et calcul du taux de conversion.

La mise en œuvre d'une lipase sous forme libre ou fixée, en l'état ou modifiée, nécessite tout d'abord la mise au point d'un procédé fiable de détermination de l'aptitude à l'interesterification. Ce procédé aurait pu être *a priori* déterminé par la mesure de l'activité hydrolytique par l'une des nombreuses méthodes décrites dans la littérature.

Dans un premier temps, la méthode mise au point par la Fuji Oil [14], puis la méthode de Novo décrite par Eigved *et al.* [45] ont été utilisées. Fuji Oil met en œuvre 20 g de substrat se décomposant en 10 g d'huile de coprah et 10 g de stéarate de méthyle soit un rapport molaire 1/2, 3 et 1 g de biocatalyseur, la réaction s'effectuant à 40 °C pendant 24 h.

Novo met en œuvre 12 ml d'une solution équimoléculaire (56 mM) de trioléine et d'acide palmitique dans l'éther de pétrole, ainsi que 275 mg de lipozyme, la réaction s'effectuant à 40 °C pendant 15 à 30 min.

Dans les deux cas, les triglycérides sont séparés des esters méthyliques (Fuji Oil) ou des acides gras libres (Novo) par chromatographie sur couche mince ou sur colonne. Fuji Oil analyse l'incorporation de l'acide laurique dans le stéarate de méthyle et Novo l'incorporation de l'acide laurique dans le stéarate de méthyle et Novo l'incorporation de l'acide palmitique dans la trioléine.

Dans les 2 cas, la réaction est considérée du premier ordre.

Fuji détermine alors l'activité spécifique de transestérification K_a ,

$$K_a = k \frac{\text{quantité de substrat (20 g)}}{\text{quantité de biocatalyseur (1 g)}} \text{ et relie } K_a \text{ à l'activité}$$

lipolytique puisqu'il considère le rapport $K_r = K_a/AL$ comme caractéristique du biocatalyseur où $K_r = \text{Activité spécifique de transestérification en valeur relative}$ et $AL = \text{Activité lipolytique spécifique exprimée en } \mu\text{M d'acides gras libérés par min et par g de biocatalyseur.}$

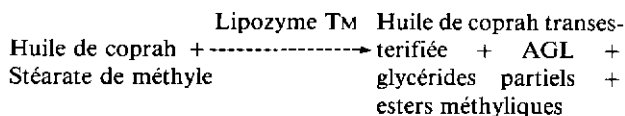
Nous avons tout d'abord utilisé la méthode de Fuji Oil mais nous nous sommes rapidement rendu compte que K_r n'a aucune signification tant pratique que théorique car il n'y a aucune relation entre les 2 types de réaction (interesterification et hydrolyse). Nous reviendrons sur ce point dans la dernière partie de cet article.

Nous nous sommes alors limités à la détermination de l'activité d'interesterification suivant Novo (proportions équimoléculaires), mais nous avons conservé les substrats de Fuji Oil (huile de coprah et stéarate de méthyle) et de plus la réaction est conduite en milieu fondu.

a) Système huile de coprah/stéarate de méthyle (équimoléculaire)

La constante de vitesse, le taux de conversion et l'AST ont été déterminés pour le lipozyme TM. La réaction s'effectue en mettant en œuvre dans des proportions équimoléculaires l'huile de coprah et le stéarate de méthyle ainsi que 2, 4, 6 et 10 % de biocatalyseur (% P/P). La quantité d'eau et l'activité de celle-ci sont déterminées à 25 °C lorsque le système réactionnel a atteint l'équilibre.

On peut dans ce cas schématiser la réaction de transestérification de la façon suivante :



Les glycérides partiels et les AGL sont des co-produits très influents dont l'étude sera développée dans la partie II concernant l'activité de l'eau des biocatalyseurs. L'incorporation progressive de l'acide laurique, acide gras traceur de la réaction dans le stéarate de méthyle permet de suivre l'évolution de la réaction de transestérification au cours du temps jusqu'à l'équilibre (Tabl. I). En tenant compte des concentrations en % molaire de 12 : 0 à l'instant t , les taux de conversion et les constantes de vitesse k ainsi que les AST (calculées pour 15 min de réaction) sont reportés dans le tableau II.

TABLEAU I. — Evolution jusqu'à l'équilibre « a » de la concentration « x » en acide laurique (% molaire) dans les fractions esters méthyliques et détermination du taux de conversion X

Temps (h)	0	0,5	1	2	4	7	12	24
« x »	0	2,3	5,1	8,1	12,9	17,0	20,5	21,9
$X = x/a$	0	0,105	0,233	0,370	0,589	0,776	0,936	0,995

Cas du lipozyme TM à 2 % (P/P) de substrat dans le système équimolaire Huile de coprah/Stéarate de méthyle où « a » = 22 % molaires.

TABLEAU II. — Evolution de l'AST en fonction de la quantité de lipozyme TM dans le système équimoléculaire huile de coprah/stéarate de méthyle

Lipozyme/corps gras % P/P	2	4	6	10
% H ₂ O final	0,20	0,31	0,46	0,81
a _w 25 °C	0,31	0,29	0,28	0,39
Temps (h) pour 100 %	24	6	2	1
taux de conversion 50 %	3	0,75	0,25	0,1
Constante de vitesse k. 10 ³ (min ⁻¹)	3,8	15,7	46,0	115,0
AST µM min ⁻¹ .g ⁻¹	330	611	883	1 589

TABLEAU III. — Evolution de l'AST du Lipozyme TM en fonction du rapport molaire coprah/stéarate de méthyle (la proportion de lipozyme est de 4 % en poids par rapport aux réactifs)

Rapport molaire	1	2	5	10	15	20	25
Réactifs (g)	0,36	0,66	1,36	2,61	3,86	5,11	6,36
Lipozyme TM (g)	0,014	0,024	0,054	0,104	0,154	0,204	0,254
« a » (% molaire)	22,0	26,2	29,8	31,2	31,7	32,0	32,2
« x » (% molaire) incorporé en 15 min	0,15	0,42	1,5	3,6	5,8	7,6	9,7
AST µM de 12 : 0/min/g	17,05	27,80	44,95	58,0	65,6	67,1	68,0

TABLEAU IV. — Mesure de l'AST du lipozyme TM avec le système huile de coprah/stéarate de méthyle dans un rapport 20/1 molaire

Lipozyme TM/corps gras % P/P	2	4	6	10
% H ₂ O final	0,13	0,37	0,56	0,85
a _w 25 °C	0,29	0,42	0,42	0,47
Temps (h) pour 100 %	24	6	4	2
taux de conversion 50 %	2	0,70	0,40	0,25
Constante de vitesse k. 10 ³ (min ⁻¹)	5,75	16,2	28,75	49,2
AST (µM.min ⁻¹ .g ⁻¹)	69,8	68,8	68,9	69,0

TABLEAU V. — Mesure de l'AST de la lipase de *Rhizopus arrhizus* sous différentes formes dans le système huile de coprah/stéarate de méthyle dans un rapport 20/1 molaire

Forme de la lipase	En l'état	Supportée	(célite) (1)	Mycélium dévitalisé
Catalyseur/corps gras % P/P	10	10	35,5	20
% H ₂ O final	0,50	0,18	0,37	0,95
a _w 25 °C	0,39	0,27	0,39	0,24
Temps (h) pour 100 %	120	144	48	48
taux de conversion 50 %	11	26	3,25	4,5
Constante de vitesse k. 10 ³ (min ⁻¹)	1,05	0,45	3,55	2,55
AST µM.min ⁻¹ .g ⁻¹	0,47	1,20	1,25	1,4

(1) 10 g de lipase sont adsorbés sur 25 g de célite.

TABLEAU VI. — AST de la lipase de *Candida deformans* sous différentes formes dans le système huile de coprah/stéarate de méthyle dans un rapport 20/1 molaire

Forme de la lipase	En l'état	Supportée	(célite) (1)	Cellules entières
Catalyseur/corps gras % P/P	10	10	35,5	30
% H ₂ O final	0,14	0,12	0,20	0,25
a _w 25 °C	0,37	0,31	0,32	0,20
Temps (h) pour 100 %	—	—	192	120
taux de conversion 50 %	104	86	20	11
Constante de vitesse k. 10 ³ (min ⁻¹)	0,11	0,13	0,58	1,05
AST µM.min ⁻¹ .g ⁻¹	0,05	0,19	0,19	0,25

(1) 10 g de lipase sont adsorbés sur 25 g de célite.

Ces différents milieux réactionnels sont caractérisés par leurs faibles pourcentages d'eau avec une activité de l'eau (a_w) à l'équilibre dans tous les cas de l'ordre de 0,3 hormis pour l'essai à 10 % de lipozyme où $a_w = 0,4$. Une telle activité de l'eau permet de privilégier la transestérification et de minimiser l'hydrolyse (les incidences de la teneur et de l'activité de l'eau seront développées dans la partie II).

Il faut remarquer que la réaction est très sensible à la quantité de biocatalyseur mise en jeu ce qui se répercute directement sur les constantes de vitesse et les durées de réaction permettant d'atteindre l'équilibre.

Toutefois, le fait que l'AST varie en fonction de la quantité de biocatalyseur mise en jeu est totalement absurde puisque l'AST est une grandeur devant être constante par définition. Dans le cas présent, ceci est d'autant plus flagrant que la variation de l'AST est quasiment proportionnelle à la quantité de biocatalyseur mise en jeu. Donc le système utilisé conduit à des aberrations pour ce qui est de caractériser les aptitudes des lipases à effectuer la transestérification en se basant sur des modèles de référence de l'hydrolyse.

Nous avons alors recherché ce qui différencie la réaction d'hydrolyse de la réaction de transestérification lorsqu'on détermine les activités spécifiques.

Dans le cas de l'hydrolyse, les 2 antagonistes sont le triester et l'eau et dans le cas de la transestérification, ce sont le stéarate de méthyle et les triglycérides de coprah.

De plus, dans le cas de l'hydrolyse, on se trouve toujours avec un large excès d'eau (donneur) alors que dans le cas de la transestérification, les quantités en triglycérides (donneur) et le stéarate de méthyle sont toujours du même ordre de grandeur. C'est le cas notamment des méthodes proposées par Novo Industri et Fuji Oil.

Or dans ces conditions, il est incorrect de faire des mesures en considérant la réaction comme de premier ordre ; en effet lorsqu'on effectue une détermination d'ordre de réaction ou de mesure de constante de vitesse, les conditions opératoires doivent être telles que seule la concentration du réactif sur lequel la mesure est effectuée soit variable, ce qui n'est pas le cas avec des mélanges équimoléculaires.

Pour respecter ce principe et se trouver dans des conditions analogues à l'hydrolyse, il est impératif de mettre en œuvre une quantité importante d'huile de coprah (donneur).

Toutefois il est nécessaire d'étudier au préalable la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat. On fait donc varier pour une même quantité de biocatalyseur les rapports molaires TG coprah/stéarate de méthyle de 1 à 25 dans des réactions avec des rapports molaires croissants établis comme suit : 1, 2, 5, 10, 20 et 25, ce qui permet de calcu-

ler pour chaque système la valeur « a » de 12 : 0 incorporé dans les esters méthyliques à l'équilibre.

La réaction de transestérification s'effectue à 50 °C pendant 15 min, sous pression réduite pour une quantité de lipozyme TM de 4 % (P/P), ce qui permet de calculer le % molaire de 12 : 0 incorporé pour ce temps de réaction et de calculer ainsi l'AST ou vitesse initiale (V_0) exprimée en μM de C12 : 0 incorporé par min et par gramme de protéines (Tabl. III).

Dans ces conditions, la variation de l'AST est hyperbolique et tend à devenir constante à partir d'un rapport molaire des réactifs de 20. Ce modèle permet donc de déterminer la vitesse initiale limite de la réaction de transestérification entre l'huile de coprah et le stéarate de méthyle ; elle devrait être indépendante de la quantité de biocatalyseur mise en réaction. Ainsi pour déterminer l'AST des différents biocatalyseurs, les différentes réactions de transestérification seront effectuées en utilisant le système coprah/stéarate de méthyle dans le rapport molaire de 20/1.

b) Système huile de coprah/stéarate de méthyle 20/1 molaire.

La réaction de transestérification s'effectue en mettant en œuvre 5,0 g d'huile de coprah et 0,11 g de stéarate de méthyle (rapport molaire 20/1) avec des quantités variables de lipozyme TM allant de 2 à 10 % (P/P) par rapport au poids total de réactifs.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV. L'activité spécifique de transestérification est constante quelle que soit la quantité de biocatalyseur utilisée ; ces résultats sont donc tout à fait convenables et le rapport molaire 20/1 est compatible avec la cinétique de la réaction. De plus la variation de la constante de vitesse k en fonction de la quantité de biocatalyseur est linéaire.

Grâce à ce principe de base, les lipases issues de 3 microorganismes différents utilisées sous diverses formes ont pu être comparées rationnellement.

Les résultats concernant les AST et l'évolution du taux de conversion en fonction de la durée des réactions sont indiqués dans le tableau V pour *Rhizopus arrhizus*, le tableau VI pour *Candida deformans* et le tableau VII pour *Mucor miehei*.

L'examen de ces tableaux permet de tirer les conclusions suivantes :

1) La réaction de transestérification s'effectue en milieu fondu (sans solvant), cependant l'apport d'une faible quantité d'eau est nécessaire afin que le biocatalyseur puisse prendre une conformation active.

TABLEAU VII. — Mesure de l'AST de la lipase de *Mucor miehei* sous différentes formes avec le système huile de coprah/stéarate de méthyle dans un rapport 20/1 molaire

Forme de la lipase	Lipozyme TM	Lipozyme en l'état	(lipase diafiltrée) Supportée (célite) (1)	<i>Mucor miehei</i> en l'état	Cellules entières
Catalyseur/corps Gras % (P/P)	4	4	10	10	20
% H ₂ O final	0,37	0,29	0,15	0,46	0,60
a_w 25 °C	0,42	0,34	0,29	0,30	0,20
Temps (h) pour 100 %	6	144	24	—	—
taux de conversion 50 %	0,70	15	2,75	630 j (2)	34 j (3)
Constante de vitesse $k \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	16,2	0,77	4,18	0,001	0,014
AST $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	68,8	0,73	6,37	0,002	0,005

(1) 10 g de lipase sont adsorbés sur 25 g de célite.

(2) Calcul théorique par extrapolation (4 j = 0,47 % de taux de conversion).

(3) Calcul théorique par extrapolation (4 j = 7,6 % de taux de conversion).

Les différents mélanges réactionnels sont caractérisés par un faible pourcentage d'eau (en général inférieur à 1 %). L'activité de l'eau, mesurée à 25 °C lorsque la réaction atteint l'équilibre est dans tous les cas de l'ordre de 0,3.

2) Pour un microorganisme donné, l'AST est constante quelle que soit la quantité de biocatalyseur et quelle que soit sa forme d'utilisation. L'adsorption de biocatalyseur sur un support minéral (célite) et surtout son immobilisation sur une résine macroporeuse échangeuse d'ions accroît d'une façon appréciable l'AST.

Ainsi pour une même quantité de lipase mise en œuvre, le rapport AST (lipase supportée sur célite)/AST (lipase en l'état) vaut environ 3 dans le cas de *Rhizopus arrhizus*, 4 pour *Candida deformans* et 9 dans le cas de la lipase de *Mucor miehei* lipozyme de Novo).

De plus, il a été vérifié que la célite apportée seule dans le mélange réactionnel n'est douée d'aucune activité de transestérification. La célite active donc les sites catalytiques des enzymes utilisées ; le degré d'activation serait fonction de l'origine de la lipase et probablement du degré de pureté de celle-ci. Le mécanisme d'activation du site actif de l'enzyme par la célite demeure encore inconnu.

Par contre, les cellules de *Candida deformans* incluses dans des billes d'alginate de calcium ont une activité de transestérification très faible ; cette activité est 120 fois plus faible que celle des cellules entières libres et le taux de conversion n'est que de 1,7 % après 3 jours de réaction. Il s'agit probablement d'un phénomène de limitation de diffusion du substrat à travers les billes d'alginate de calcium. Le calcium étant responsable de la réticulation, donc de la résistance mécanique des billes, nous avons tenté l'utilisation d'une concentration faible en CaCl_2 ; au lieu de 0,2 M, nous avons opéré avec une concentration de 100 mM ; parallèlement, afin d'abaisser au maximum la viscosité du mélange réactionnel, les corps gras (huile de coprah + stéarate de méthyle) ont été dissous dans l'hexagone à raison de 5 % (P/V). Toutes ces tentatives n'ont pas permis de lever la limitation diffusionnelle interne du substrat. L'activité d'une telle préparation est toujours très faible.

Dans le cas des lipases de *Mucor miehei* sous forme de lipozyme, l'activité du lipozyme TM (lipase 3A de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse, échangeuse d'anions) est, d'une part 94 fois plus importante que celle du lipozyme (lipase 3A en l'état), soit $68,8 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ et $0,73 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ respectivement et d'autre part 11 fois plus élevée que l'activité du lipozyme adsorbée sur la célite (AST = $6,37 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). En somme, à 4 % P/P (biocatalyseur/ Σ corps gras) dans le mélange réactionnel, le lipozyme TM fait en 6 heures ce que fait le lipozyme (lipase 3A en l'état) en 6 jours ou en 1 jour quand il est supporté par la célite.

3) Pour un microorganisme donné, l'AST ainsi que le taux de conversion pour une durée identique de réaction varient en général dans le sens suivant : lipase libre ou en l'état < lipase supportée (célite) < cellules dévitalisées < lipase fixée sur la résine.

4) Pour les différents microorganismes étudiés, l'AST ainsi que le taux de conversion pour une durée donnée de réaction varient dans ce sens : *Mucor miehei* (lipozyme TM) > *Mucor miehei* (lipozyme) > *Rhizopus arrhizus* > *Candida deformans* > *Mucor miehei*.

5) L'utilisation de cellules entières semble être une solution prometteuse, en ce sens que sur le plan technique et économique, elles sont plus faciles à produire que les lipases elles-mêmes, car l'obtention de ces dernières nécessite des processus de précipitation et des purifications.

De plus, les cellules permettent de disposer d'une lipase fixée naturellement et elles peuvent être confinées aisément soit simplement par mélange avec un support minéral comme la silice, soit dans un réticulum convenable.

Sur le plan économique, un réacteur à lit fixe de cellules confinées serait bien moins onéreux qu'un réacteur à lit fixe composé d'une lipase fixée.

Pour toutes ces raisons, le recyclage du mycelium de *Rhizopus arrhizus* et des cellules de *Candida deformans* ainsi que celui du lipozyme TM ont été effectués et les activités résiduelles ont été déterminées (Tabl. VIII).

L'activité résiduelle (au 3^e recyclage) vaut 91 % de l'activité initiale dans le cas du mycelium de *Rhizopus arrhizus* et 90 % pour les cellules de *Candida deformans* avec des taux de conversion qui ne sont pratiquement pas affectés.

La lipase cellulaire de ces deux souches affiche donc une résistance quasiment identique contre les chocs mécaniques et thermiques. Le même constat peut s'appliquer au lipozyme TM pour lequel 3 recyclages successifs ne font perdre que 5 % d'activité.

Graille [46] a estimé le coût d'un kg de catalyseur à base de cellules de *Rhizopus arrhizus* et fait remarquer qu'il se situe entre 30 et 40 FF par kg, soit 100 fois moins cher que le lipozyme TM de Novo. Cependant le lipozyme TM fait en quelques heures (1 h à 6 h selon la quantité de biocatalyseur utilisée) ce que fait le mycélium de *Rhizopus arrhizus* en un jour. De toutes façons, les deux facteurs essentiels sont le coût de production du biocatalyseur et sa durée de vie.

2. — Interestérification et hydrolyse.

Rappelons que Fuji Oil [14] analysant l'incorporation du C12 : 0 dans le stéarate de méthyle relie l'activité d'interestérification à l'activité lipolytique pour considérer le rapport $K_r = K_a/A_L$ comme caractéristique du biocatalyseur, K_r étant l'activité spécifique d'interestérification en valeur relative.

Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer les K_r des différents biocatalyseurs. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IX et nous nous sommes rapidement rendu compte que K_r n'a aucune signification tant pratique que théorique car il n'y a aucune relation entre la réaction d'interestérification et celle d'hydrolyse.

TABLEAU VIII. — Effet des recyclages successifs sur l'activité des biocatalyseurs sélectionnés

	Mycelium <i>Rhizopus arrhizus</i>				Cellules entières de <i>Candida deformans</i>				Liposyme TM de <i>Mucor miehei</i>			
N° recyclage	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
AST $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	1,41	1,32	1,30	1,28	0,25	0,237	0,230	0,227	69,8	67,9	66,4	65,6
Activité résiduelle (%)	100	93,6	92,2	90,8	100	94,8	92,0	90,8	100	97,3	95,1	94,0

En effet, en examinant les résultats on note que :

— le lipozyme a une très forte activité lipolytique ($AL = 24\,000\ \mu M$ d'AG libérés/min/g d'enzyme) mais une faible activité de transestérification relative ($Kr = 0,43 \cdot 10^{-6}$ d'enzyme/ μM d'AG) ;

— les cellules de *Candida deformans* sont caractérisées par une très faible activité lipolytique et présentent une activité de transestérification moyenne ;

— le mycélium de *Rhizopus arrhizus* a une très forte activité de transestérification bien que son activité lipolytique soit pratiquement nulle ;

— le lipozyme TM caractérisé par une activité lipolytique moyenne a une très forte activité de transestérification ;

— les cellules de *Mucor miehei* ont une activité lipolytique très faible voire nulle mais une activité de transestérification élevée.

De même, si l'on compare les activités lipolytiques des biocatalyseurs aux activités spécifiques de transestérification déterminées avec le système huile de coprah/stéarate de méthyle 20/1 molaire, on constate que :

— le lipozyme a une très forte activité lipolytique ($AL = 24\,000,00\ \mu M$ d'AG/min/g d'enzyme) mais une faible activité de transestérification ($AST = 0,73\ \mu M$ de 12 : 0/min/g d'enzyme) ;

— le lipozyme TM caractérisé par une activité lipolytique moyenne ($AL = 3\,850\ \mu M$ d'AG/min/g d'enzyme) a une très forte activité de transestérification ($AST = 69,81\ \mu M$ 12 : 0/min/g d'enzyme) ;

— les cellules de *Rhizopus arrhizus* ont une activité de transestérification non négligeable alors que leur activité lipolytique est très faible ;

— les cellules de *Candida deformans* sont caractérisées par une faible activité lipolytique et présentant une activité de transestérification faible ;

— les cellules de *Mucor miehei* ont une activité lipolytique très faible voire nulle et une activité de transestérification également nulle.

Tous ces résultats montrent donc qu'il n'y a pas de relation entre les 2 activités et qu'une préparation catalytique ayant une forte activité lipolytique peut présenter indifféremment une faible, voire nulle, ou une forte activité d'interesterification ; il en est de même pour une préparation catalytique ayant une faible activité lipolytique.

Ainsi, il paraît inadéquat d'exprimer les activités spécifiques de transestérification (AST) en terme d'unité hydrolytique car ces 2 réactions sont complètement indépendantes.

CONCLUSION

L'interesterification régiosélective 1-3 catalysée par les lipases spécifiques 1-3 dans le but d'ajuster d'une part l'insaturation des huiles végétales, notamment l'huile de palme et sa partie concrète et d'autre part obtenir des bases grasses convenables implique un contrôle de l'activité spécifique de transestérification permettant une comparaison significative et fiable des divers biocatalyseurs mis en œuvre.

Les lipases de *Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus* et *Mucor miehei* ont été étudiées sous diverses formes [lipase en l'état, lipase fixée (célite ou résine) et cellules dévitalisées]. Deux substrats, l'huile de coprah et le stéarate de méthyle, ont été retenus pour déterminer l'activité spécifique de transestérification. Si l'on conduit l'expérimentation avec un rapport équimolaire de substrats, l'activité spécifique de transestérification varie en fonction de la quantité de biocatalyseur utilisée, ce qui est incorrect par définition. L'étude poursuivie avec un rapport molaire de 20/1 (huile de coprah/stéarate de méthyle) est tout à fait compatible avec la cinétique de la réaction et cette activité est dans ce cas constante.

Il a été établi que pour les 3 microorganismes étudiés, l'activité spécifique de transestérification varie dans le sens suivant : lipase en l'état < lipase fixée (célite) < lipase immobilisée (résine).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les cellules dévitalisées de *Rhizopus arrhizus*, le lipozyme (lipase de *Mucor miehei*, diafiltrée et lyophilisée) et le lipozyme TM (lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse, échangeuse d'anions).

Les cellules de *Candida deformans*, le mycélium de *Rhizopus arrhizus* et le lipozyme TM présentent une activité pratiquement stable au cours de leur recyclage.

Il a été montré également que l'activité d'interesterification est indépendante de l'activité lipolytique ; ainsi une préparation catalytique ayant une forte activité lipolytique peut présenter indifféremment une faible ou forte activité d'interesterification et inversement. Les méthodes consistant à exprimer les activités de transestérification en terme d'unité hydrolytique sont donc inadéquates.

Seules les formes les plus actives des lipases des 3 microorganismes, à savoir cellules dévitalisées par *Rhizopus arrhizus*, mycélium pour *Candida deformans* et Lipozyme TM pour *Mucor miehei*, ont été utilisées pour la suite du travail concernant l'influence de l'activité de l'eau des biocatalyseurs sur les taux de conversion et l'apparition des acides gras libres et des glycérides partiels. Cette étude fait l'objet de la partie II.

TABLEAU IX. — Parallèle entre activité lipolytique et activité de transestérification des différents biocatalyseurs

	<i>Rhizopus arrhizus</i>			<i>Candida deformans</i>			<i>Mucor miehei</i>			
	Lipase en l'état	Supportée	Mycélium dévitalisé	Lipase en l'état	Supportée	Cellules entières	Lipase en l'état	Cellules entières	Lipozyme	Lipozyme TM
$Ka \cdot 10^4 (\min^{-1})$	15,45	45,25	116,05	10,0	35,0	24,0	0,075	0,773	103	2 037
$AL (\mu M \text{ d'AG libérés } \min^{-1} \cdot g^{-1})$	6 190	7 910	6,6	2 540	4 300	151	300	0,55	24 000	3 850
$Kr \cdot 10^{-6} (g \text{ d'enzyme } / \mu M \text{ d'AG})$	0,25	0,57	1 758	0,39	0,81	15,8	0,03	140,55	0,43	53
$AST (1) (\mu M \text{ 12:0 } \min^{-1} \cdot g^{-1})$	0,47	1,25	1,41	0,05	0,19	0,25	0,002	0,005	0,73	69,8

(1) AST : déterminée avec le système coprah/stéarate de méthyle 20/1 molaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GOING L. H. (1967) — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **44**, p. 414-456
- [2] NAUDET M. (1974). — *Rev. fr. Corps Gras*, **21**, p. 35-43.
- [3] NAUDET M. (1976) — *Rev. fr. Corps Gras*, **23**, p. 387-391.
- [4] SREENIVASAN B. (1978). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **55**, p. 796-805
- [5] NORRIS F. A. & MATTIL K. F. (1946) — *Oil and Soap*, **23**, p. 289-291
- [6] FREEMAN I P. (1968) — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **45**, p. 456-460
- [7] ECKEY E. W. (1956). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **33**, p. 575-579.
- [8] CHOBANOV D. & CHOBANOVA R. (1977). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **54**, p. 47-50.
- [9] ADHIKARI S., DASGUPTA J., BHATTACHARYYA D. K. & CHAKRABARTY M. M. (1981). — *Fette Seifen Anstrichmittel*, **83**, p. 262-267
- [10] DASGUPTA J., ADHIKARI S., CHAKRABARTY M. M. & BHATTACHARYYA D. K. (1982) — *Fette Seifen Anstrichmittel*, **84**, p. 111-114
- [11] ROST H. E. (1961). — *Oléagineux*, **3**, p. 157-161.
- [12] RASTOIN J. (1985) — *Rev. fr. Corps Gras*, **32**, p. 97-102.
- [13] FUJI OIL Co Ltd, (1976). — Brevet Fr 2.307 472.
- [14] FUJI OIL Co Ltd, (1981). — Brevet EO 035 883
- [15] UNILEVER N. V., (1977). — Brevet Fr 2.340 979.
- [16] NOVO INDUSTRI A/S, (1984) — Brevet EO.140 542
- [17] STEVENSON R. W., LUDDY F. E. & ROTHBART H. L. (1979). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **56**, p. 676-680
- [18] YOKOZEKI K., YAMANAKA S., TAKINAMI K., HIROSE Y., TANAKA A., SONOMOTO K. & FUKUI S. (1982) — *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, p. 1-5.
- [19] MACREA A. R. (1983). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **60**, p. 291-294.
- [20] MACREA A. R. (1983) — Extracellular microbial lipases In : *Microbial enzymes and Biotechnology*, p. 225-250, Edited by Fogarty M. W., Applied Science Publishers, London and New York.
- [21] MACREA A. R. (1984) — Microbial lipase as catalysts for the interesterification of oils and fats. In : *Biotechnology for oil and fats industry*, p. 189-198 Ralledge C., Dawson P. and Ratray J. (eds) Amer. Oil Chem. Soc. monograph. Printed in USA.
- [22] NIELSEN T. (1985) — *Fette Seifen Anstrichmittel*, **87**, p. 15-19.
- [23] HANSEN T. T. & EIGTVED P. — A new immobilized lipase for interesterification and esters synthesis — in Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the fats and oils industry (1986), p. 365-369 Cannes (France) 1985 — Edited by Baldwin A. R., Amer. Oil Chem. Soc. Printed in USA
- [24] KALO P., VAARA K. & ANTILA M. (1986). — *Fette Seifen Anstrichmittel*, **88**, p. 362-365
- [25] BELLO M., PIEVIC M., ADENIER H., THOMAS D. et LEGOY L. (1986). — *C.R. Acad. Sc. Paris*, **303**, p. 187-192.
- [26] MATSUSHIMA A., KODERA Y., TAKAHASHI K., SAITO Y. & INADA Y. (1986) — *Biotechnol. Letters*, **8**, p. 73-78
- [27] GALZY P., RATOMAHENINA R., GRAILLE J. et PINA M. (1986) — *Rev. fr. Corps Gras*, **33**, p. 307-310
- [28] SCHUCH R. et MUKHERJEE K. D. (1987). — *J. Agric. Food Chem.*, **35**, p. 1005-1008.
- [29] GRAILLE J., MUDERHWA J. M. & PINA M. (1987). — *Fat Science Technology*, **89**, p. 224-226.
- [30] HOFMANN A. F. & BORGSTROM B. (1964). — *J. Clin. Invest.*, **43**, p. 247-257
- [31] SCOW R. O. & BLANCHETTE-MACKIE E. J. (1985). — *Prog. Lipid Res.*, **24**, p. 197-241
- [32] SONNTAG N. O. V. (1982). — Fat splitting, esterification and interesterification, In : *Bailey's industrial oil and fat products*, vol. 2, 4th Ed., p. 97-173, Swern D. (ed.), John Wiley and Sons, New York.
- [33] MUDERHWA J. M., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. & GALZY P. (1985). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **62**, p. 1031-1036.
- [34] MUDERHWA J. M., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. & GALZY P. (1986) — *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, p. 348-354.
- [35] IUPAC — Détermination de la teneur en acides gras en position 2 dans les triglycérides. Division de Chimie Appliquée — Commission des matières grasses et dérivés, 6^e Ed., 1^{re} partie (Sections I et II) 2 201
- [36] DAVIES C. H., SIESS M. H. et JEANBLANC M. F. (1979) — Utilisation des levures incluses en fermentation alcoolique ; « cellules immobilisées », p. 151-172, Colloque organisé par la Société de Microbiologie Industrielle, 8-9 mars, U T Compiègne France.
- [37] SPETTOLI P., BOTTACIN A., NUTI M. P. & ZAMORANI A. (1981). — *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, p. 1-5
- [38] KISTAN M. P. J. and COUGHLAN M. P. — Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment. In : *Immobilized cells and enzymes : a practical approach*, p. 43-44, Edited by Woodward, IRL Press, Oxford — Washington D.C.
- [39] LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDALL R. J. (1951). — *J. Biol. Chem.*, **193**, p. 265-275.
- [40] STICKLAND L. M. (1951). — *J. Gen. Microbiol.*, **5**, p. 698-701
- [41] MENASSA A. (1981). — Thèse de Docteur Ingénieur, « Sciences Agonomiques » — INA — Paris Grignon, 79 pages.
- [42] BROCKERHOFF H. (1965). — *J. Lipid Res.*, **8**, 167-169.
- [43] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1987) — *Rev. fr. Corps Gras*, **34**.
- [44] AFNOR (1984) — Recueil de Normes Françaises des Corps Gras, graines oléagineuses et produits dérivés. 3^e ed., NF T 60 223, p. 95-104.
- [45] EIGTVED P., HANSEN T. T. and HUGO-JENSEN B. (1986) — Novo method for the determination of lipase batch interesterification activity — Preliminary product information, AF 206, p. 1-12.
- [46] GRAILLE J. (1987). — Communication personnelle, présentée aux « 1987 International oil palm/palm oil Conferences, Progress and prospects » juillet 1987, Kuala Lumpur (Malaisie).

SUMMARY

Transesterification ability of a few 1-3 regioselective lipases.

I. — Determining the specific activity of transesterification — comparison between interesterification and hydrolysis in lipase action.

J. MUDERHWA, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 10, p. 385-392.

The specific transesterification activity of 3 1-3 regioselective lipases from 3 different microorganisms (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus* and *Mucor miehei*) in different forms (lipase in its original state, fixed (celite) or immobilized (resin) lipase and devitalized cells) was determined on two substrates, copra oil and methyl stearate, placed under reaction conditions in a 20/1 molar ratio. The best activity was obtained with the *Mucor miehei* lipase immobilized on resin (lipozyme TM). Nonetheless, the interesterification reaction ability shown by the enzymes in the cell form could prove to be particularly interesting from an economic point of view, especially since recycling them has practically no effect on their effectiveness. Placed in parallel, lipolytic and interesterification activity are revealed to be two activities independent from each other.

RESUMEN

Habilidad de algunas lipasas regioselectivas 1-3 para la transesterificación.

I. — Determinación de la actividad específica de transesterificación — comparación entre interesterificación e hidrólisis en la acción de lipasas.

J. MUDERHWA, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 10, p. 385-392.

La actividad específica de transesterificación de 3 lipasas regioselectivas 1-3 procedentes de 3 microorganismos distintos (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus* y *Mucor miehei*), empleadas bajo diversas formas [lipasa en su estado de origen, lipasa fijada (celita) o inmovilizada (resina) y células desvitalizadas] se estableció sobre dos sustratos, o sea aceite de copra y estearato de metilo, puestos a reaccionar en una relación de 20/1 molar. La mejor actividad se obtuvo con la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada sobre resina (lipozima TM). Ahora bien, la habilidad para la reacción de interesterificación mostrada por las enzimas empleadas bajo la forma de células podría resultar particularmente interesante desde el punto de vista económico, más aún cuando su reciclado no altera casi su eficacia. Un paralelo que se hizo entre la actividad lipolítica y la actividad de interesterificación muestra que estas dos actividades son independientes una de otra.